

535667

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年6月3日 (03.06.2004)

PCT

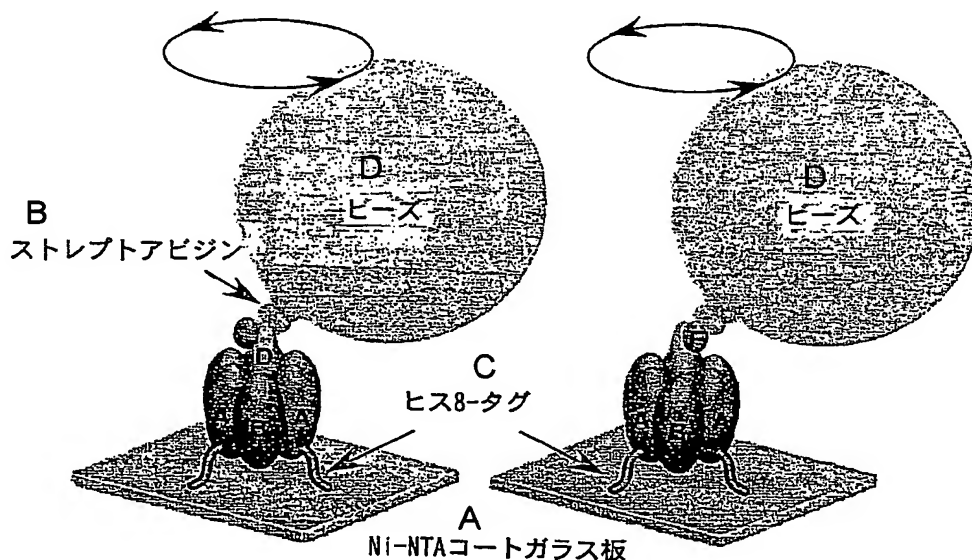
(10) 国際公開番号  
WO 2004/046350 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/16, 15/55 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012982 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今村 博臣 (IMA-MURA, Hiromi) [JP/JP]; 〒227-0048 神奈川県 横浜市 青葉区柿の木台3-2-13 コーポカワハラ203 Kanagawa (JP). 吉田 賢右 (YOSHIDA, Masasuke) [JP/JP]; 〒251-0035 神奈川県 藤沢市 片瀬海岸1-9-13-1103 Kanagawa (JP). 横山 謙 (YOKOYAMA, Ken) [JP/JP]; 〒194-0032 東京都 町田市 本町田1-165-2 B Tokyo (JP).  
(22) 国際出願日: 2003年10月9日 (09.10.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ: 特願2002-337212 2002年11月20日 (20.11.2002) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号 Saitama (JP).  
(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (国内): US.

[続葉有]

(54) Title: ROTARY MOTOR MOLECULE V<sub>1</sub>-ATPase

(54) 発明の名称: 回転モーター分子V<sub>1</sub>-ATPase



A...Ni-NTA COATED GLASS PLATE  
B...STREPTOAVIDIN  
C...HIS8-TAG  
D...BEAD

(57) Abstract: Complex molecule comprising one D-subunit, three B-subunits and three A-subunits constituting V<sub>1</sub> portion of V<sub>0</sub>V<sub>1</sub>-ATPase, characterized in that the complex molecule performs rotational motion in the presence of ATP.

(57) 要約: V<sub>0</sub>V<sub>1</sub>-ATPaseのV<sub>1</sub>部分を構成するAサブユニット3個、Bサブユニット3個、Dサブユニット1個を有する複合体分子であって、ATP存在下で回転

[続葉有]

WO 2004/046350 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明細書

回転モーター分子  $V_1$ -ATPase

5

## 技術分野

この出願の発明は、マイクロマシンやナノマシンの駆動部（ナノアクチュエータ）等として有用な新規回転モーター分子  $V_1$ -ATPase に関するものである。

10

## 背景技術

分子サイズの大きさで機械的な動きをするマイクロマシンやナノマシンの開発が注目されている。このようなマイクロマシンやナノマシンは、例えば、分子コンピューターの配線を加工する分子ロボットや体内で治療作業を行う医療用ロボットとして有望視されているからである。

15

マイクロマシンやナノマシンを作成するためには、個々の要素デバイス（センサ、アクチュエータ、ミニチュア機械）や、それらの組立方法（マイクロマシニングやナノマシニング）に至るまで、様々な技術開発が必要とされている。特に、マイクロマシン駆動部であるマイクロアクチュエータやナノアクチュエータ（回転モーター）の開発は、マシンの自律運動にとって不可欠であり、様々な微細加工技術を利用したモーターデバイスの開発が進められている。しかしながら微細加工技術を応用した方法で作成できるマイクロアクチュエータは、小さいものでも 100  $\mu\text{m}$  程度であり、マイクロマシンやナノマシンに装備するには、モーター装置の更なる微少化が求められている。

20

そこで、微細加工技術によってモーターを構築するのではなく、回転運動能を有する単一分子をモーターとして利用することが提案されている。

25

一般に、モーターとして利用できる分子は、外部エネルギーを回転運動に変換する動力機構があること、および1方向の回転を実現できることの2点を満たすことが求められている。そして、このような条件を満たす低分子有機化合物とし

ては、例えば、

(3R, 3' R) - (P, P) - trans-1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4' - octahydro-3, 3' - dimethyl-4, 4' - bipheanthrydiene (Nature 401:152-155, 1999) と Triptycyl (4) helicene (Nature  
5 401:150-152, 1999) が知られている。前者は、炭素-炭素二重結合を挟んで左右対称的な形を持っているが、立体的な込み合いのためねじれた構造となっている。これに適当な熱や光を加えると4つのプロセスを経て1方向に回転させることができる。また2回の光反応と熱異性化反応で1サイクルを完了し、1方向のみに進行する。すなわち、この有機化合物は、熱異性化反応と光反応とによって  
10 回転運動を行う。光反応による回転は非常に速い（ピコセカンドのレベル）が、熱異性化反応による回転には数分以上かかるため、実用化に適していない。また、駆動力が極めて弱いという問題点を有している。一方、後者はフォスゲン付加反応とウレタン結合形成、開裂という化学反応を利用して分子の一方向の回転を示す。しかしながら、この分子は繰り返し回転ができないという、アクチュエータとしての致命的な欠陥を有している。  
15

一方、マイクロマシンやナノマシン等に利用可能な単一分子モーターとしては、鞭毛モーター (Microbiol. 6:1-18, 1967, Nature 245:380-382, 1973)、ATP 合成酵素 (Nature 386:299-302, 1997)、ミオシンモーター (Biochem. Biophys. Res. Comm. 199:1057-1063, 1994, Curr. Opin. Cell Biol. 7: 89-93, 1995)、微小  
20 管系モーター (Cell 42:39-50, 1985)、核酸合成酵素の運動タンパク質 (Nature 409: 113-119, 2001) 等の生体分子も知られている。

このうち、ATP 合成酵素は、真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核細胞膜などに普遍的に存在する膜タンパク質であり、細胞の消費する ATP の大部分を合成している。ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ -ATP 合成酵素) は分子量約  
25 50 万にも及ぶ巨大膜タンパク質複合体であり、膜中に存在する  $F_0$  部分と膜の外に存在する  $F_1$  部分からなる。 $F_0$  部分は膜をプロトン ( $H^+$ ) が通過するために通り道になっており、 $F_1$  部分には ATP を合成/加水分解する触媒部位がある。 $F_1$  部分の分子量は約 38 万であり、例えばバクテリア由来の ATP 合成酵素における  $F_1$  部

分のサブユニット組成は $\alpha_3\beta_3\delta\gamma_1\varepsilon_1$ である。 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットはどちらにも似たような ATP 結合部位を有するが、触媒活性は $\beta$ サブユニットにある。両者は交互に並んでリングを形成しており、この $\alpha_3\beta_3$ リングの中心部に $\gamma$ サブユニットが存在している。 $\delta$ サブユニットは $\alpha_3\beta_3$ リングの頂上に結合し、ATP 加水分解活性を制御している $\varepsilon$ サブユニットは $\gamma$ サブユニットに結合している。一方、 $F_0$ 部分は分子量約 10 万であり、そのアミノ酸組成は、プロトンの移動に必須なグルタミン酸およびアスパラギン酸を多く含んでいる。サブユニット組成は $a_1b_2c_{9-12}$ であり、 $c$ サブユニットは膜の中でリング状に配列し（ $c$ リング）、それに $a$ サブユニットと、膜の外に長く突き出した腕を持つ $b$ サブユニット 2 個が結合している。従って、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素は、 $F_1$ 部分と $F_0$ 部分とが、 $\gamma\varepsilon$ - $c$ リング、 $\delta$ - $b_2$ の 2 箇所では結合している。さらに特筆すべきは、この  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素分子が 2 種類のトルク発生装置を備えている点である。一つは  $F_1$  部分に存在する ATP 駆動型装置であり、他方は  $F_0$  部分に存在するプロトン駆動型装置である。すなわち、 $F_0$  部分がプロトンを細胞膜内に取り込む場合には  $c$  リングが時計回りに回転し、プロトンを細胞膜外に排出する場合には  $c$  リングは反時計回りに回転する。一方、 $F_1$  部分は、ATP 合成時にはその  $\gamma$  サブユニットが  $F_0$  側からみた場合に時計回りに回転し、ATP 分解時には反時計回りに回転する。そして、このような 2 種類のトルク発生装置を備えることによって、ATP 合成酵素が生み出すトルクは数十ピコニュートン・nm であり、分子モーターとしての十分な駆動力を有している。また水系で作動するため体内でのアクチュエータとして最適であり、アクチンを十分に動かす力があるために生体内の蛋白質、糖質、脂質、核酸を操作することも可能である。

そしてこの出願の発明者らは、この  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素分子を改良して、広範な回転速度の制御が可能な改変型  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素分子とその利用発明を既に発明し、特許出願している（特願 2002-148232：出願日 2002 年 5 月 22 日）。また、最近になって、 $F_1$ -ATP 合成酵素分子に亜鉛結合部位を導入し、亜鉛によって回転の開始・停止を制御することのできる回転モーター分子が報告されてもいる

(Nature Materials 1:173-177, 2002)。

前記のとおり、様々な回転モーター分子がマイクロマシンやナノマシン等の駆動部材として提案されており、回転の形態や回転数、トルク、回転の制御方法等  
5 においてそれぞれに特徴を有している。従って、実際にマイクロマシンやナノマシンを作成するためには、その用途やマシン構成に応じて多くの候補分子から適切なものを選択する必要がある。しかしながら、これまでに報告されている回転モーター分子のそれぞれは、マイクロマシンやナノマシンの他種多様な用途や構成の全てに対応可能であるとは言い難い。そのため、マイクロマシンやナノマシン等の開発に当たっては、回転モーター分子のラインナップを一つでも多く充実  
10 させることが望まれている。

従って、この出願は、従来の回転モーター分子とは特性の異なった新しい回転モーター分子を提供することを課題としている。

また出願は、その回転運動をさらに円滑なものにするために、さらには回転運動の伝達手段等を分子に付加するために改良された新規回転モーター分子を提供  
15 することを課題としてもいる。

#### 発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、 $V_0V_1$ -ATPase の  $V_1$  部分を構成する A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個を有する複合体分子であって、ATP 存在下で回転運動することを特徴とする回転モーター分子  $V_1$ -ATPase を提供する。  
20

この発明の  $V_1$ -ATPase は、触媒部位の A サブユニットを含み、A と B サブユニットは交互に配列し、 $F_0F_1$ -ATPase の  $\alpha_3\beta_3$  のように六量体の円筒を形成するものであって、D サブユニットは  $A_3B_3$  の円筒の中央の空洞を埋めており、F サブユニットは、D サブユニットに結合しており、D サブユニットと F サブユニットは、  
25 回転子（回転シャフト、回転軸）として働く。

この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、耐熱性分子であることを一つの態

様としており、その場合に好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の分子であることを好ましい態様としている。

さらにこの好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、A サブユニットに相当する配列番号 3 のポリペプチド 3 個、B サブユニットに相当する配列番号 4 のポリペプチド 3 個、D サブユニットに相当する配列番号 5 のポリペプチド 1 個を有する複合体であることを一つの好ましい態様としている。

さらにこの発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、配列番号 3 における第 232 番目 Ser 残基の Ala 残基への置換、および第 235 番目 Thr 残基の Ser 残基への置換の少なくとも一方を有する改変型分子であることを別の態様としている。

この改変された  $V_1$ -ATPase は、触媒部位である A サブユニットを改変することにより MgADP 阻害が解消され、ATP 加水分解活性が亢進する。すなわち野生型  $V_1$ -ATPase は MgADP 阻害によって回転が抑制される傾向にあるが、MgADP 阻害が解消された変異型  $V_1$ -ATPase は、効率よい回転運動を示す。

またさらに、この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、A サブユニットおよび B サブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子であることを別の態様としている。そしてこの場合には、A サブユニットの N 端に結合した His タグを介して基板上に固定されていることを好ましい態様としている。

この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase はまた、D サブユニットにジョイント部材が結合していることを別の態様としている。そしてこの場合には、配列番号 5 における第 48 番目 Glu 残基を置換した Cys 残基、および第 55 番目 Gln 残基を置換した Cys 残基の少なくとも一方の Cys 残基にジョイント部材を結合していること、さらには A サブユニットおよび B サブユニットにおける全ての Cys 残基が非 Cys 残基に置換されていることをそれぞれ好ましい態様としている。

すなわち、この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、細菌や真核生物のオルガネラ（液胞、リソソーム、ゴルジ体、細胞膜、被覆小胞、分泌顆粒等）に存在する V 型（液胞膜型）ATPase ( $V_0V_1$ -ATPase) の、 $V_1$  部分（A サブユニット 3 個、B

サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個からなる複合体) である。従来、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素が回転モーター分子として機能することは知られていたが、この  $V_0V_1$ -ATPase の  $V_1$  部分 ( $V_1$ -ATPase) が回転運動することは全く知られていなかった。この発明の  $V_1$ -ATPase は、A サブユニット 3 個および B サブユニット 3 個によって構成される「筒状体」の内側に位置する D サブユニットが回転シャフトとして機能することを初めて見出して完成されたものである。

なお、 $V_0V_1$ -ATPase の  $V_1$  部分は D サブユニットに F サブユニット 1 個を結合しているが、この発明の  $V_1$ -ATPase はこの F サブユニットを結合した分子をも包含する。また、この発明の  $V_1$ -ATPase は野性型だけでなく、前記のとりの各種変異体をも包含する。さらに、前記の Nature Materials 1:173-177, 2002 に開示されているような亜鉛認識部位の導入変異体をも包含する。

以下、発明の実施形態を示し、前記各発明について詳しく説明するが、この発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y, 1995 等の記載を参考にすることができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_1$ -ATPase の回転観察の状態を示した模式図である。矢印は回転方向を示す。

図 2 は、D または F サブユニットのビオチン化を確認したウェスタンブロット分析の結果である。左側 (レーン 1-4) は CBB 染色、右側 (レーン 5-8) は alkaline phosphatase-streptavidine コンジュゲート染色である。レーン 1 および 5 は D サブユニットがビオチン化された  $V_1$ -ATPase、レーン 2 および 6 はビオチン化さ



れた F サブユニットを持つ  $V_1$ -ATPase、レーン 3 および 7 はビオチン化されていない  $V_1$ -ATPase、レーン 4 および 8 は分子量マーカーである。

図 3 は、D サブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を測定した結果である。A は 4mM ATP、0.5 mM sodium azide 存在下でのビーズの回転である。B-D は sodium azide 非存在下で、B は 4 mM ATP、C は 0.5 mM ATP、D は 0.2 mM ATP 溶液中でのビーズ回転の結果である。

図 4 は、F サブユニットに固定したビーズ回転の経時変化を、4 mM ATP 溶液中で測定した結果である。

10

#### 発明を実施するための最良の形態

この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、各種細菌や真核生物が産生する  $V_0V_1$ -ATPase の  $V_1$  部分 ( $V_1$ -ATPase) であり、この  $V_1$ -ATPase をコードするポリヌクレオチド (DNA 断片、RNA 断片。好ましくは cDNA 断片。以下「 $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチド」と記載することがある) を用いて遺伝子工学的に製造することができる。すなわち  $V_0V_1$ -ATPase をコードするポリヌクレオチド (cDNA 断片) の配列は公知のデータベース (例えば GenBank データベース : URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等) において多数公開されており、これらの配列情報を利用したプローブハイブリダイゼーション法や PCR 法によって既存の cDNA ライブラリー等から容易に取得することができる。

そして、この  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドを公知の遺伝子工学的方法で発現させることによって、A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、D サブユニット 1 個からなる複合体  $V_1$ -ATPase を取得することができる。例えば、例えば、RNA ポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドを組換え、この組換えベクターをプロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、回転能を有する  $V_1$ -ATPase をインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA

25

- ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。また、V<sub>1</sub>-ATPase ポリヌクレオチドを適当な宿主ベクター系において発現させれば、回転モーター分子
- 5 V<sub>1</sub>-ATPase を大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞などで生産することができる。例えば、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターにポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿
- 10 主細胞を形質転換し、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的のV<sub>1</sub>-ATPase 分子を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。さらに、ポリヌクレオチドを真核細胞で発現させる場合には、ポリヌクレオチドをプロモーター、スプライシング領域、ポリ (A) 付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作製し、このベクターをトランス
- 15 フェクトした真核細胞から目的のV<sub>1</sub>-ATPase 分子を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓細胞 HEK293、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。形質転換細胞で発現
- 20 させたV<sub>1</sub>-ATPase を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせで行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

またこのこの発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase は、工業的な利用の観点から、耐熱性分子であることが好ましい。従って、65℃以上で生育する *Thermus* 属、*Methanococcus* 属や *Sulfolobus* 属等の細菌由来の  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドを使用することが好ましい。さらに、70℃以上でも生育することができる好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドを使用することが特に好ましい。この *Thermus thermophilus* 由来の  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドは配列番号 1 に示した塩基配列を有している。この *Thermus thermophilus* 由来の  $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド (F サブユニット)、配列番号 3 のポリペプチド (A サブユニット)、配列番号 4 のポリペプチド (B サブユニット) および配列番号 5 のポリペプチド (D サブユニットからなる複合体) をコードしている。従って、配列番号 1 の 334-4196 nt 配列を前記の遺伝子工学的方法により発現させることにより、A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個および D サブユニット 1 個からなる耐熱性  $V_1$ -ATPase を得ることができる。また配列番号 1 の 1-4196 nt 配列を発現させることによって、D サブユニットに F サブユニット 1 個を結合した耐熱性  $V_1$ -ATPase を得ることができる。

この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase のさらに別の好ましい態様は、配列番号 3 における第 232 番目 Ser 残基の Ala 残基への置換、および第 235 番目 Thr 残基の Ser 残基への置換の少なくとも一方、さらに好ましくはこれらの置換の両方を有する改変型分子 (以下、両方の置換を有する分子を「TSSA 変異体」と記載することがある) である。すなわち、真核細胞の  $V$ -ATPase と異なり、*T. thermophilus* 等の細菌由来の  $V_1$ -ATPase は触媒の代謝回転の間、いわゆる MgADP 阻害によって反応が中断するという傾向を有しており (J Biol Chem 273, 20504-20510, 1998)、通常は ATP を基質として加えてから 5 分以内この ADP 抑制を示し、約 10 分間で ATP 加水分解を停止する。そこでこの出願の発明者らは幾つかの変異体を作成して ADP 抑制の効果を検討した結果、前記の TSSA 変異体が、ATP を基質として加えてから 1 時間も ATP 活性を持続させることを見出した。

この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase のさらにまた別の好ましい態様は、A サブユニットまたはBサブユニットの少なくとも一方が基板上に固定されている改変型分子である。すなわち、この固定によって、D サブユニットの回転を効率よく伝達することが可能となる。このようなAおよび／またはBサブユニットの基板への結合は、例えば共有結合を用いた各種の方法によって行うことができるが、好ましくは、AサブユニットのN端にHis タグ（ヘクタヒスチジン）を結合させ、この His タグを Ni-NTA スライドに結合する方法（Nature 386:299-302, 1997; FEBS Letters 470:244-248, 2000）を採用することができる。

- 10 この発明の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase はまた、D サブユニットにジョイント部材が結合していることを別の好ましい態様としている。この場合の「ジョイント部材」とは、 $V_1$ -ATPase における D サブユニットの回転運動を他の部材（例えば、ギアや運動機関のシャフト等）に伝達するための部材である。またこのジョイント部材は他の部材との連結用としてではなく、 $V_1$ -ATPase の回転を観察するための「プローブ」、あるいは「プロペラ」としても利用することができる。このようなジョイント部材としては、例えば後記実施例に例示したようなビーズを複数個連結したもの（マイクロスフェア）や、あるいはアクチンフィラメント（Nature 386:299-302, 1997）等の微細繊維を利用することができる。そして、このようなジョイント部材は、D サブユニットの Cys 残基に、例えばマレイミド、
- 20 ジスルフィド結合等によって結合することができる。ただし、配列番号5にアミノ酸配列を示した *Thermus thermophilus* 由来  $V_1$ -ATPase の D サブユニットには Cys 残基が存在しないため、適当な非 Cys 残基を Cys 残基に置換する必要がある。そこでこの発明は、配列番号5における第48番目 Glu 残基を置換した Cys 残基、および第55番目 Gln 残基を置換した Cys 残基の少なくとも一方（好ましくは両
- 25 方）の Cys 残基にジョイント部材を結合していることを好ましい態様とする。また、D サブユニット以外の Cys 残基（A サブユニットの合計9個、B サブユニットの合計3個）にジョイント部材が結合しないように、これらの Cys 残基を他の残基（例えば Ser 残基）に置換することが好ましい。

また、ジョイント部材は D サブユニットではなく、D サブユニットに結合した F サブユニットに結合させることもできる。その場合には、例えば配列番号 2 のアミノ酸における第 28 番目 Ser および／または第 35 番目 Ser 残基を Cys 残基に  
5 置換し、これらの Cys 残基にジョイント部材を結合させればよい。

なお、前記の各変異体  $V_1$ -ATPase は、 $V_1$ -ATPase ポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸残基をコードするトリプレットを、ミューテーション・キット等を使用する方法、変異導入型の PCR 法、ポリヌクレオチド合成法（例えば、Nucleic Acid Res. 25:3440-3444, 1997 等）によって置換し、この変異型ポリヌクレオチ  
10 ドを遺伝子工学的的方法によって発現させることによって取得することができる。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 15 1. 材料と方法

#### 1-1. タンパク質の調製

*T. thermophilus* HB8 由来  $V_1$ -ATPase の A、B、D、F の各サブユニットをコードする DNA 配列を lac プロモーター支配下に保持しているプラスミド pUCV1 によって形質転換した大腸菌株 BL21-CodonPlus-RP (Stragene) を用いて  $V_1$ -ATPase を発  
20 現させた。なお、A、B、D、F の各サブユニットをコードする DNA 配列には以下の変異体作成のための改変を加えた（アミノ酸位置は配列番号 2 - 5 に対応する）。

I :  $V_1$ -ATPase (A-His8-tags/ $\Delta$ Cys/A-S232A/A-T235S/D-E48C/D-Q55C)

- (1) A サブユニットの N 端に His タグを結合 (A-His8-tags)
- (2) A および B サブユニットの全ての Cys 残基が Ser 残基に置換 ( $\Delta$ Cys)
- 25 (3) A サブユニットの第 232 番目 Ser が Ala に置換 (A-S232A)
- (4) A サブユニットの第 235 番目 Thr が Ser に置換 (A-T235S)
- (5) D サブユニットの第 48 番目 Glu が Cys に置換 (D-E48C)
- (6) D サブユニットの第 55 番目 Gln が Cys に置換 (D-Q55C)

II :  $V_1$ -ATPase (A-His8-tags/ $\Delta$ Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C)

- (1) A サブユニットの N 端に His タグを結合 (A-His8-tags)
- (2) A および B サブユニットの全ての Cys 残基が Ser 残基に置換 ( $\Delta$ Cys)
- 5 (3) A サブユニットの第 232 番目 Ser が Ala に置換 (A-S232A)
- (4) A サブユニットの第 235 番目 Thr が Ser に置換 (A-T235S)
- (7) F サブユニットの第 28 番目 Ser が Cys に置換 (S28C)
- (8) F サブユニットの第 35 番目 Ser が Cys に置換 (S35C)

形質転換細胞を、0.3M NaCl を含む 20mM imidazole/HCl (pH8.0) に懸濁し、65℃  
 10 で 30 分間熱処理をした後、熱に不安定なタンパク質を除き、 $Ni^{2+}$ -affinity  
 column (Amersham) に供して 0.3M NaCl を含む 0.5M imidazole/HCl (pH8.0) で溶出  
 した。緩衝液をかえ、限外濾過 (VIVA-Spin, VIVA science) し、RESOURCE Q column  
 に供した。 $V_1$ -ATPase を含む部分を Superdex 200 column (Amersham) にかけ、コ  
 ンタミネーションしているタンパク質を除去した。精製された  $V_1$ -ATPase を 2 モ  
 15 ル 過 剰 の 6-[N'-[2-(N-maleimido)ethyl] -N-piperazinylamido] hexyl  
 D-biotinamide (biotin-PEAC<sub>5</sub>-malaimide, Dojindo) でビオチン化した。25℃で  
 15 分間インキュベーションした後、タンパク質を PD-10 Column (Amersham) に  
 供し、未反応試薬を除いた。D および F サブユニットのビオチン化は、  
 streptavidin-alkalinephosphatase conjugate (Amersham) を用いて、ウエスタン  
 20 プロットニングにより確認した (図 2)。

#### 1-2. 回転観察

5  $\mu$ l のフローセルを、2 枚のカバースリップ (50nm 厚のスペーサーを介在)  
 から作成した。底のガラス表面は  $Ni^{2+}$ -nitrilotriacetic acid でコートし、ビオ  
 チン化した  $V_1$ -ATPase (0.1-1  $\mu$ M) を緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM KCl,  
 25 5mM  $MgCl_2$ , and 0.5% (w/v) BSA からなる A 溶液中でフローセルに注入し、His タ  
 グをガラスに結合させて  $V_1$ -ATPase を固定した。

0.1% (w/v) の Streptavidin でコートしたビーズ ( $\phi = 0.56 \mu m$ , Bangs  
 Laboratories inc.) 溶液をフローセルに満たし、未結合ビーズは洗浄除去して、

biotin-streptavidine 結合によってDまたはFサブユニットにビーズを結合した。

$V_1$ -ATPase 分子の回転は、所定濃度の ATP 中 (0.2mg/ml creatine kinase と 2.5mM creatine phosphate ATP 再生システム中) で、ビーズの回転を明視野顕微鏡 (IX70, Olympus、倍率 1000) を使用して観察した。また回転の状態は CCD カメラでビデオ記録した。なお、この  $V_1$ -ATPase の回転観察システムは、 $F_1$ -ATPase の回転システム (Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13649-54, 2001) と同様である。すなわち、回転はDまたはFサブユニットに結合したビーズにより、斜めに結合された形で観察された (図 2)。

## 10 1-3. その他のアッセイ

タンパク質濃度は UV 測定によって行った。ATP 加水分解活性は、pyruvate kinase と lactate dehydrogenase とをカップリングさせた NADH 酸化により測定した。

## 2. 結果

### 15 2-1. 回転の観察

$V_1$ -ATPase (A-His8-tags/  $\Delta$  Cys/A-S232A/A-T235S/ D-E48C/D-Q55C) および  $V_1$ -ATPase (A-His8-tags/ $\Delta$  Cys/A-S232A/A-T235S/F-S28C/F-S35C) の 2 つの変異体について回転を観察した。2 つの変異体は、同じような Michaelis Menten タイプの Kinetics を示し、 $K_m=0.3-0.5$ mM,  $V_{max}$  (turnover rate)  $\approx 10$ sec $^{-1}$  を示した。これらの数値は、野生型の FoF $_1$ -ATP 合成酵素と同程度であった (J Biol Chem 273, 20504-1014, 1998)。

### 2-2. D サブユニットの回転

ATP を含む緩衝液をフローセルに注入させる場合に、 $V_1$ -ATPase の D サブユニットに結合したビーズの回転が観察された (図 3 A-3D)。一つのフローセルでは、5-10 個の回転ビーズが観察された。

回転は一方向であり、 $F_1$ -ATPase の回転方向と同様に、細胞膜側からみると常に反時計回りであった。ATP を含まない緩衝液中では、ブラウン運動との区別のつく一方向の回転は観察されなかった。

アジド (Azide) は  $F_1$ -ATPase の ATPase 活性も回転も阻害するが (Nature 386, 299-302, 1997)、 $V_1$ -ATPase の ATPase 活性は阻害していないことが知られている (J Biol Chem 265, 21946-50, 1990)。変異体  $V_1$ -ATPase の回転についても同様  
5 であり、アジド (Azide) は 4mM ATP 存在下 (図 3 A、B) や 0.1mM ATP 存在下での  $V_1$ -ATPase の回転に影響を与えなかった。

4mM ATP 存在下での平均回転数は、約 2.6 rps (revolutions per sec : 回転数 / 秒) 以下であった。1 mM ATP 存在下での平均回転数は約 2.4 rps 以下であった。  
1 回転に 3 分子の ATP が使用されると仮定すれば、回転速度は、バルクの酵素反  
10 応速度論 ( $\sim 10$  ATPs の加水分解 / 秒) から観察される ATP 加水分解速度に良く一致している。また、0.5 mM ATP では平均回転数は約 2.2 rps と低下している (図 3 C)。

### 2-3. F サブユニットの回転

F サブユニットに結合したビーズ回転も観察された。4 mM ATP 濃度の条件では、  
15 1 ~ 3 個の回転ビーズが観察された (図 4)。回転方向も常に反時計回りであった。回転速度は、約 2.5 rps であり、D サブユニットの回転速度と同程度であった。

### 産業上の利用可能性

20 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、新規の回転モーター分子としての  $V_1$ -ATPase が提供される。また、この回転モーター分子  $V_1$ -ATPase のさらに実用的形態としての各種変異体  $V_1$ -ATPase が提供される。これらは、マイクロマシンやナノマシン等の作成に大きく寄与する。

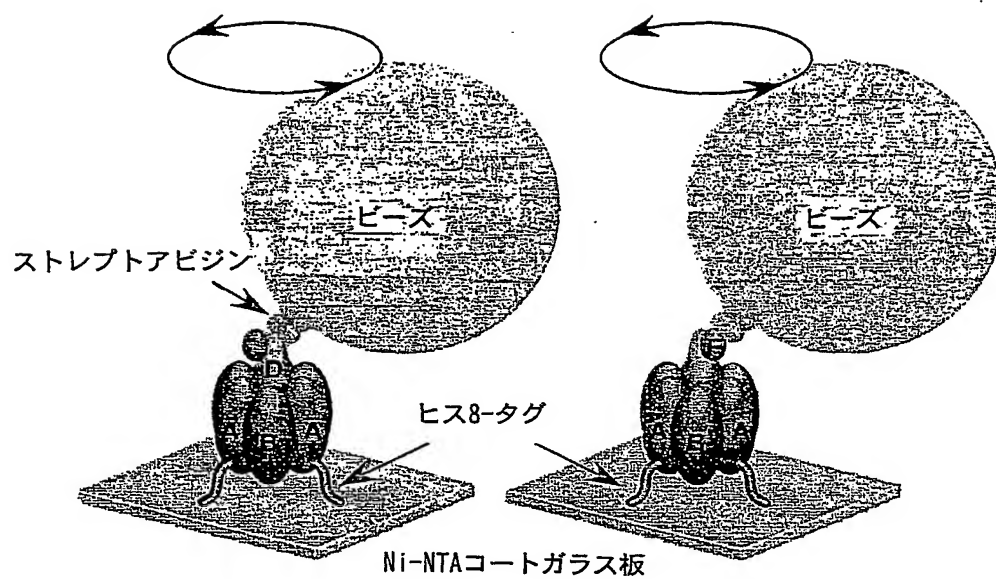


## 請求の範囲

1.  $V_0V_1$ -ATPase の  $V_1$  部分を構成する A サブユニット 3 個、B サブユニット 3 個、  
D サブユニット 1 個を有する複合体分子であって、ATP 存在下で回転運動すること  
5 とを特徴とする回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
2. 耐熱性を有する請求項 1 の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
3. 好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来である請求項 2 の回転モーター分子  
 $V_1$ -ATPase。
4. A サブユニットに相当する配列番号 3 のポリペプチド 3 個、B サブユニット  
10 に相当する配列番号 4 のポリペプチド 3 個、D サブユニットに相当する配列番号  
5 のポリペプチド 1 個を有する複合体である請求項 3 の回転モーター分子  
 $V_1$ -ATPase。
5. 配列番号 3 における第 232 番目 Ser 残基の Ala 残基への置換、および第 235  
番目 Thr 残基の Ser 残基への置換の少なくとも一方を有する請求項 4 の回転モー  
15 ター分子  $V_1$ -ATPase。
6. A サブユニットおよび B サブユニットの少なくとも一方が基板上に固定さ  
れている請求項 1 から 5 のいずれかの回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
7. A サブユニットの N 端に結合した His タグを介して基板上に固定されている  
請求項 6 の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
8. D サブユニットにジョイント部材が結合している請求項 1 から 7 のいずれ  
20 かの回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
9. 配列番号 5 における第 48 番目 Glu 残基を置換した Cys 残基、および第 55  
番目 Gln 残基を置換した Cys 残基の少なくとも一方の Cys 残基にジョイント部材  
を結合している請求項 8 の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。
10. A サブユニットおよび B サブユニットにおける全ての Cys 残基が非 Cys  
25 残基に置換されている請求項 9 の回転モーター分子  $V_1$ -ATPase。

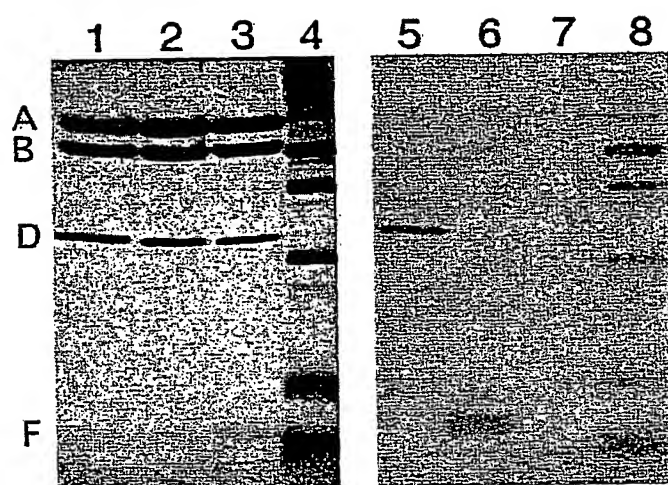
1/4

図 1



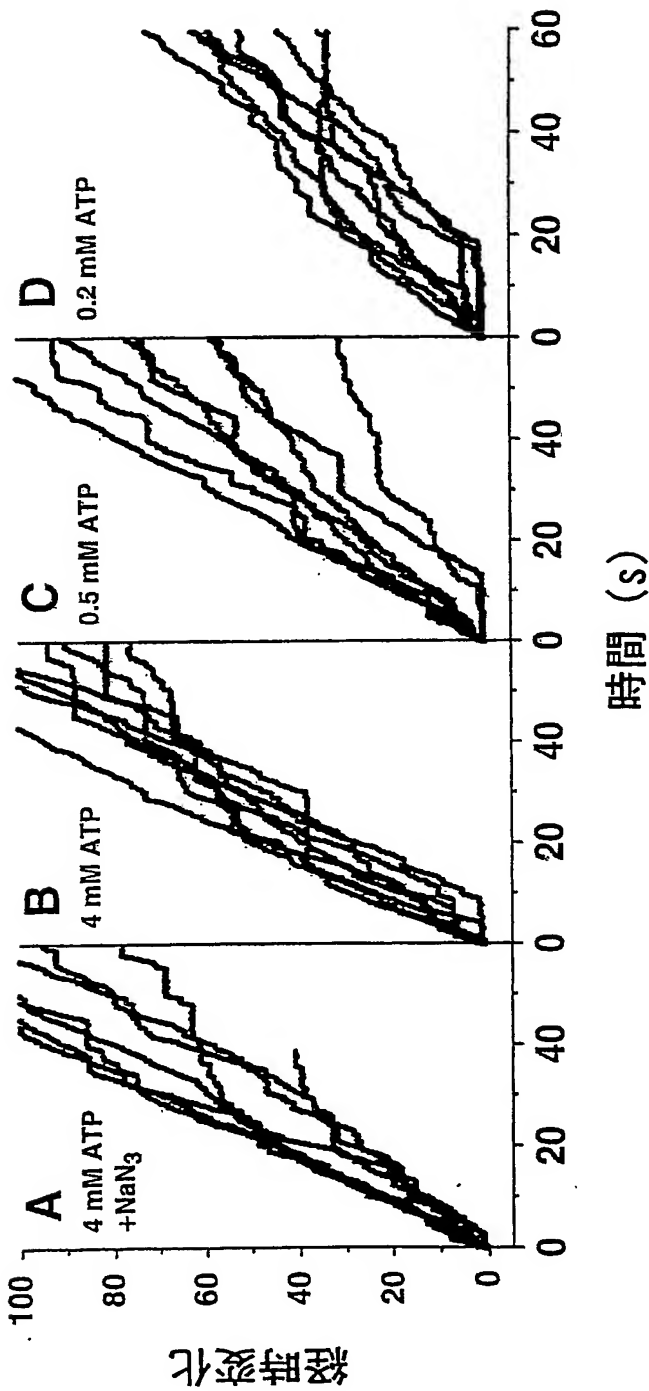
2/4

図 2



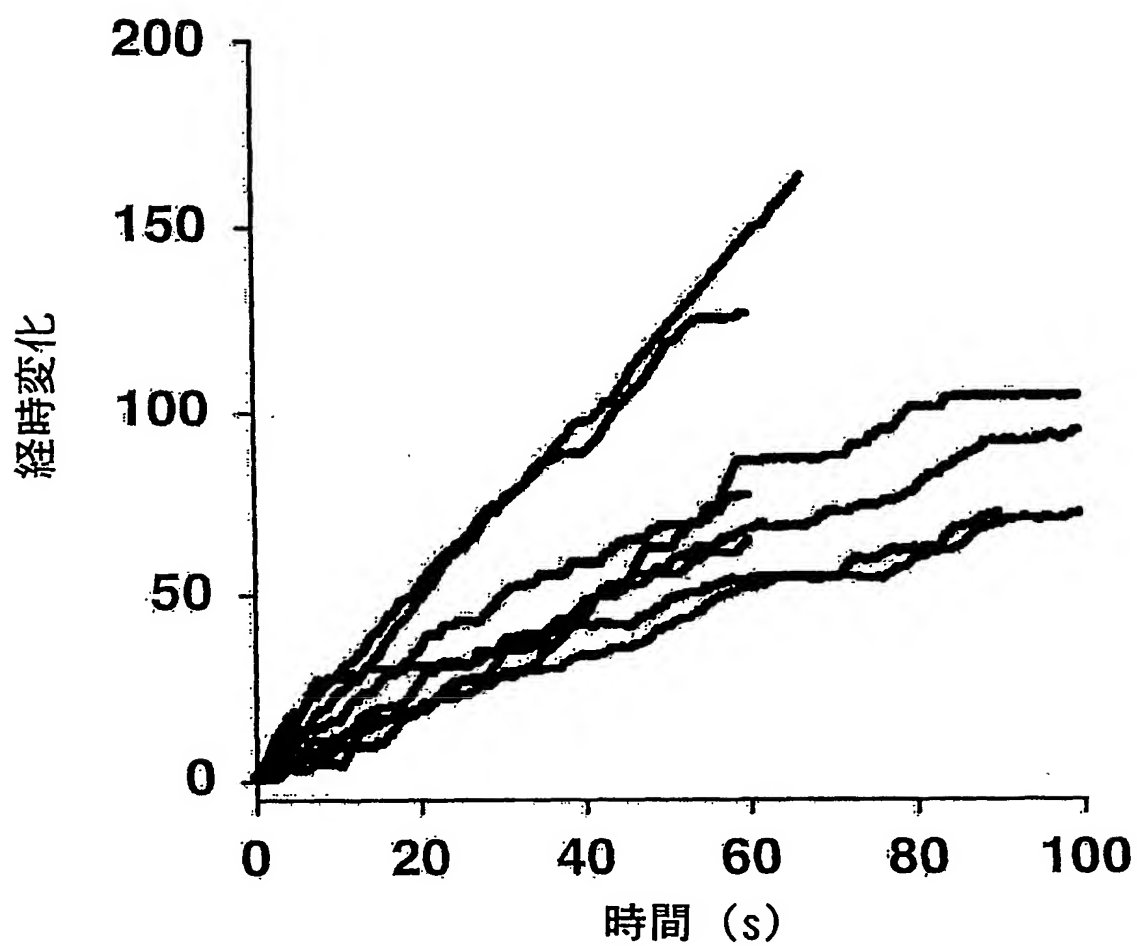
3/4

図 3



4/4

図 4



1/13

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; A Rotary Motor molecule V1-ATPase

&lt;130&gt; 03F044PCT

&lt;140&gt; JP2002-337212

&lt;141&gt; 2002-11-20

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4199

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thermus thermophilus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (318)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (334).. (2067)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2081).. (3514)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3528).. (4196)

&lt;400&gt; 1

gtg agg atg gcg gtg atc gcc gat ccc gag acc gcc cag ggg ttc cgg 48

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg

1

5

10

15

ctc gcg ggc ctc gag ggc tac ggg gcc tct tcg gcg gag gag gcc caa 96

Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln

20

25

30

agc ctc ctg gaa acc ctc gtg gag cgg ggc ggc tac gcc ctg gtg gcc 144

Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala

35

40

45

gtg gac gag gcg ctc ctc ccc gac ccc gag cgg gcg gtg gag cgc ctc 192

Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu

50

55

60

atg cgg ggc agg gac ctc ccc gtg ctc ctg ccc atc gcg ggg ctg aag 240

Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys

2/13

65	70	75	80	
gag gcc ttc cag ggg cac gac gtg gaa ggc tac atg cgg gag ctg gtg	288			
Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val				
85	90	95		
agg aag acc atc ggc ttt gac atc aag ctg tagaatggag ggacg atg atc	339			
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu		Met Ile		
100	105			
caa ggg gtg atc cag aag atc gcg ggc ccg gcg gtg atc gcc aag ggc	387			
Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala Lys Gly				
110	115	120		
atg ctc ggg gcc cgc atg tac gac atc tgc aag gtg ggc gaa gag ggc	435			
Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu Glu Gly				
125	130	135	140	
ctc gtg ggc gag atc atc cgc ctg gac ggg gac acg gcc ttc gtc cag	483			
Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe Val Gln				
145	150	155		
gtc tac gag gac acc tcg ggc cta aag gtg ggg gag ccc gtg gtc tcc	531			
Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val Val Ser				
160	165	170		
acg ggg ctt ccc ttg gcg gtg gag ctc ggc ccc ggg atg ctg aac ggc	579			
Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu Asn Gly				
175	180	185		
atc tac gac ggc atc cag cgc ccc ctg gag cgc atc cgg gag aag acg	627			
Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu Lys Thr				
190	195	200		
ggg atc tac atc acc cgg ggc gtg gtg gtc cac gcc ctg gac cgg gag	675			
Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp Arg Glu				
205	210	215	220	
aag aag tgg gcc tgg acg ccc atg gtc aag ccc ggg gac gag gtg cgg	723			
Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu Val Arg				
225	230	235		
ggg ggt atg gtc ctg ggc acg gtg ccc gag ttc ggc ttc acc cac aag	771			
Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr His Lys				
240	245	250		
atc ctg gta ccc ccg gac gtg cgg ggc cgg gtc aag gag gtg aag ccc	819			
Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val Lys Pro				
255	260	265		
gcc ggg gag tac acc gtg gag gag ccg gtg gtg gtc ctc gag gac ggc	867			
Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu Asp Gly				

3/13

270	275	280	
acc gag ctc aag atg tac cac acc tgg ccc gtt cgc cgg gcg agg ccc			915
Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala Arg Pro			
285	290	295	300
gtg caa agg aag ctt gac ccc aac acc ccc ttc ctc acg ggg atg cgc			963
Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly Met Arg			
305	310	315	
atc ctg gac gtc ctc ttc ccc gtg gcc atg ggg ggc acc gcc gcc atc			1011
Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala Ala Ile			
320	325	330	
cct ggg ccc ttc ggc agc ggc aag acc gtg acc cag cag tcc ctg gcc			1059
Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser Leu Ala			
335	340	345	
aag tgg tcc aac gcc gac gtg gtg gtc tac gtg ggc tgc ggg gag cgg			1107
Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly Glu Arg			
350	355	360	
ggg aac gag atg acc gac gtg ctc gtg gag ttc ccc gag ctc acc gac			1155
Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu Thr Asp			
365	370	375	380
ccc aag acg ggg ggg ccc ttg atg cac cgc acc gtc ctc atc gcc aac			1203
Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile Ala Asn			
385	390	395	
acc tcc aac atg ccc gtg gcc gcc cgc gag gcc agc atc tac gtg ggc			1251
Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr Val Gly			
400	405	410	
gtg acc atc gcc gag tac ttc cgc gac cag ggc ttc tcc gtg gcc ctc			1299
Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val Ala Leu			
415	420	425	
atg gcc gac tcc acg agc cgc tgg gcc gag gct ttg cgc gag atc tct			1347
Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu Ile Ser			
430	435	440	
agc cgc ctc gag gag atg ccc gcc gag gag ggc tac ccg ccc tac ctc			1395
Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro Tyr Leu			
445	450	455	460
gcc gcc agg ctc gcc gcc ttc tac gag cgg gcg ggc aag gtc atc acc			1443
Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val Ile Thr			
465	470	475	
ctg ggc ggc gag gag ggg gcg gtg acc atc gtg ggg gcc gtc tcc ccg			1491
Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val Ser Pro			



4/13

480	485	490	
ccg ggc ggc gac atg tcc gag ccc gtg acc cag tcc acc ttg agg atc			1539
Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu Arg Ile			
495	500	505	
gtg ggg gcc ttc tgg cgg ctt gac gcc tcc ctg gcc ttc cgc cgc cac			1587
Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg Arg His			
510	515	520	
ttc ccc gcc atc aac tgg aac ggc tcc tac agc ctc ttc acc tcc gcc			1635
Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Ser Ala			
525	530	535	540
ctt gac ccc tgg tac cgg gag aac gtg gcc gag gac tac ccc gag ctc			1683
Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro Glu Leu			
545	550	555	
cgc gac gcc atc tcc gag ctt ttg cag cgg gag gcg ggc ctc cag gag			1731
Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu Gln Glu			
560	565	570	
atc gtc cag ctc gtg ggg ccg gac gcc ctc cag gac gcc gag cgc ctc			1779
Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu Arg Leu			
575	580	585	
gtc att gag gtg ggc cgg atc atc cgc gag gac ttc ctg cag cag aac			1827
Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln Gln Asn			
590	595	600	
gcc tac cac gag gtg gac gcc tac tgc tcc atg aag aag gcc tac ggg			1875
Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala Tyr Gly			
605	610	615	620
atc atg aag atg atc ctc gcc ttc tac aag gag gcg gag gcg gcc atc			1923
Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala Ala Ile			
625	630	635	
aag cgg ggg gtt tcc ata gac gag atc ctg cag ctc ccc gtt ctg gag			1971
Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu			
640	645	650	
cgc atc ggc cgc gcc cgc tac gtg agc gag gag gag ttc ccc gcc tac			2019
Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro Ala Tyr			
655	660	665	
ttt gag gag gcc atg aag gag atc cag ggg gcc ttc aag gcc ctg gcc			2067
Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala Leu Ala			
670	675	680	
taaaggggga gag atg gac ctt ctg aag aag gag tac acg ggc atc acc			2116
Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr			

5/13

685	690	695	
tac atc tcg ggg cct ctt ctc ttc gtg gag aac gcc aag gac ctg gcc			2164
Tyr Ile Ser Gly Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala			
700	705	710	
tac ggg gcc atc gtg gac atc aag gac ggc acg ggc cgg gtc cgc ggc			2212
Tyr Gly Ala Ile Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly			
715	720	725	
ggc cag gtg att gag gtc tcc gag gag tac gcc gtc atc cag gtg ttt			2260
Gly Gln Val Ile Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe			
730	735	740	
gag gaa acc act ggg ctg gac ctg gcc acg acc agc gtg agc ctg gtg			2308
Glu Glu Thr Thr Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val			
745	750	755	760
gag gac gtg gcc cgg ctt ggg gtc tcc aag gag atg ctg ggc cgc cgc			2356
Glu Asp Val Ala Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg			
765	770	775	
ttc aac ggc atc ggc aag ccc ata gac ggc ctg ccg ccc atc acc ccg			2404
Phe Asn Gly Ile Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro			
780	785	790	
gag aag cgg ctc ccc atc acc ggc ctt ccc tta aac ccc gtg gcc cgg			2452
Glu Lys Arg Leu Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg			
795	800	805	
agg aag ccg gag cag ttc atc cag acg ggc atc tcc acc att gac gtg			2500
Arg Lys Pro Glu Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val			
810	815	820	
atg aac acc ctg gtc cgg ggg cag aag ctt ccc atc ttc tcc ggc tcg			2548
Met Asn Thr Leu Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser			
825	830	835	840
ggg ctt ccc gcc aac gag atc gcc gcc cag atc gcc cgc cag gcc acg			2596
Gly Leu Pro Ala Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr			
845	850	855	
gtg cgc ccc gac ctc tcc ggg gag ggg gag aag gag gag ccc ttc gcc			2644
Val Arg Pro Asp Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala			
860	865	870	
gtg gtc ttc gcc gcc atg ggg atc acg cag cgg gag ctc tcc tac ttc			2692
Val Val Phe Ala Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe			
875	880	885	
atc cag gag ttt gag cgc acc ggg gcc ctg agc cgc tcc gtc ctc ttc			2740
Ile Gln Glu Phe Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe			

6/13

890	895	900	
ctg aac aag gcg gac gac ccc acc att gag cgc atc ctc acc ccc cgc			2788
Leu Asn Lys Ala Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg			
905	910	915	920
atg gcc ctc acc gtg gcc gag tac ctg gcc ttt gag cac gac tac cac			2836
Met Ala Leu Thr Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His			
	925	930	935
gtc ctc gtc atc ctc acg gac atg acc aac tac tgc gag gcc ttg cgg			2884
Val Leu Val Ile Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg			
	940	945	950
gag atc ggg gcc gcc cgc gag gag atc ccg ggc cgc cgc ggt tac ccc			2932
Glu Ile Gly Ala Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro			
	955	960	965
ggc tac atg tac acc gac ctg gcc acc atc tac gag cgc gcc ggg gtg			2980
Gly Tyr Met Tyr Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val			
	970	975	980
gtg gag ggg aag aag ggg agc gtg acc cag atc ccc atc ctc tcc atg			3028
Val Glu Gly Lys Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met			
985	990	995	1000
ccc gac gac gac cgc acc cac ccc atc ccc gac ctc acg ggc tac atc			3076
Pro Asp Asp Asp Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile			
	1005	1010	1015
acc gag ggg cag atc cag ctc tcc cgg gag ctc cac cgc aag ggc atc			3124
Thr Glu Gly Gln Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile			
	1020	1025	1030
tac ccg ccc att gac ccc ttg ccc tcc ctc tcc cgg ctc atg aac aac			3172
Tyr Pro Pro Ile Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn			
	1035	1040	1045
ggc gtg ggc aag ggc aag acc cgg gag gac cac aag cag gtc tcc gac			3220
Gly Val Gly Lys Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp			
	1050	1055	1060
cag ctc tac tcc gcc tac gcc aac ggg gtg gac atc cgg aag ctc gtg			3268
Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val			
1065	1070	1075	1080
gcc atc atc ggc gag gac gcc ctc acg gag aac gac cgc cgt tac ctc			3316
Ala Ile Ile Gly Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu			
	1085	1090	1095
cag ttc gcc gac gcc ttt gaa cgg ttc ttc atc aac cag ggg cag cag			3364
Gln Phe Ala Asp Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln			

7/13

1100	1105	1110	
aac cgc tcc att gag gag agc ctg cag atc gcc tgg gcc ctc ctc tcc			3412
Asn Arg Ser Ile Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser			
1115	1120	1125	
atg ctg ccc cag ggc gag ctc aag cgc atc tcc aag gac cac atc ggc			3460
Met Leu Pro Gln Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly			
1130	1135	1140	
aag tac tac ggc cag aag ctg gag gag atc tgg ggc gcg ccc cag gcc			3508
Lys Tyr Tyr Gly Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala			
1145	1150	1155	1160
ctg gac taaggagg tag atg agc cag gtg agc ccc acc cgg atg aac			3557
Leu Asp	Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn		
	1165	1170	
ctt ctg cag agg cgg ggg cag ctc cgc ctg gcg cag aag ggg gtg gac			3605
Leu Leu Gln Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp			
1175	1180	1185	
ctc ctc aag aag aag cgg gac gcc ctg gtg gcc gag ttc ttc ggc ctg			3653
Leu Leu Lys Lys Lys Arg Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu			
1190	1195	1200	
gtg cgg gag gcc atg gag gcc agg aag gcc ctg gac cag gcg gcc aag			3701
Val Arg Glu Ala Met Glu Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys			
1205	1210	1215	1220
gag gcc tac gcc gcc ctc ctc ctg gcc cag gcc ttt gac ggg ccg gag			3749
Glu Ala Tyr Ala Ala Leu Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu			
1225	1230	1235	
gtg gtg gcg ggg gcg gcc ctt ggg gtc ccg ccc ctc gag ggg gtg gag			3797
Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu			
1240	1245	1250	
gcg gag gtg gag aac gtc tgg ggg agc aag gtg ccg agg ctc aag gcc			3845
Ala Glu Val Glu Asn Val Trp Gly Ser Lys Val Pro Arg Leu Lys Ala			
1255	1260	1265	
acc ttc ccc gac ggg gcc ctc ctt tcc ccg gtg ggg acc ccg gcc tac			3893
Thr Phe Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ser Pro Val Gly Thr Pro Ala Tyr			
1270	1275	1280	
acc ctc gag gcc agc cgg gcc ttc cgc cgc tac gcc gag gcc ctg atc			3941
Thr Leu Glu Ala Ser Arg Ala Phe Arg Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Ile			
1285	1290	1295	1300
cgg gtg gcc aac acc gag acc cgc ctg aag aag atc ggg gag gag atc			3989
Arg Val Ala Asn Thr Glu Thr Arg Leu Lys Lys Ile Gly Glu Glu Ile			

8/13

	1305	1310	1315	
aag aag acc acg cgg cgg gtg aac gcc ctg gag cag gtg gtg atc ccg				4037
Lys Lys Thr Thr Arg Arg Val Asn Ala Leu Glu Gln Val Val Ile Pro				
	1320	1325	1330	
ggg atc cgc gcc cag atc cgc ttc atc cag cag gtc ctg gag cag cgg				4085
Gly Ile Arg Ala Gln Ile Arg Phe Ile Gln Gln Val Leu Glu Gln Arg				
	1335	1340	1345	
gaa cgg gag gac acc ttc cgc ctc aag cgc atc aag ggc aag att gag				4133
Glu Arg Glu Asp Thr Phe Arg Leu Lys Arg Ile Lys Gly Lys Ile Glu				
	1350	1355	1360	
gcc cgg gag gcc gag gag gag ggc ggc cgg ccc aac ccg cag gtg gag				4181
Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Gly Gly Arg Pro Asn Pro Gln Val Glu				
	1365	1370	1375	1380
atc ggg gcg ggc ctt taa				4199
Ile Gly Ala Gly Leu				
	1385			

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermus thermophilus

&lt;400&gt; 2

Val Arg Met Ala Val Ile Ala Asp Pro Glu Thr Ala Gln Gly Phe Arg			
1	5	10	15
Leu Ala Gly Leu Glu Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Ala Glu Glu Ala Gln			
20	25	30	
Ser Leu Leu Glu Thr Leu Val Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Leu Val Ala			
35	40	45	
Val Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp Pro Glu Arg Ala Val Glu Arg Leu			
50	55	60	
Met Arg Gly Arg Asp Leu Pro Val Leu Leu Pro Ile Ala Gly Leu Lys			
65	70	75	80
Glu Ala Phe Gln Gly His Asp Val Glu Gly Tyr Met Arg Glu Leu Val			
85	90	95	
Arg Lys Thr Ile Gly Phe Asp Ile Lys Leu			
100	105		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 578

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thermus thermophilus

9/13

&lt;400&gt; 3

Met Ile Gln Gly Val Ile Gln Lys Ile Ala Gly Pro Ala Val Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Gly Met Leu Gly Ala Arg Met Tyr Asp Ile Cys Lys Val Gly Glu  
 20 25 30  
 Glu Gly Leu Val Gly Glu Ile Ile Arg Leu Asp Gly Asp Thr Ala Phe  
 35 40 45  
 Val Gln Val Tyr Glu Asp Thr Ser Gly Leu Lys Val Gly Glu Pro Val  
 50 55 60  
 Val Ser Thr Gly Leu Pro Leu Ala Val Glu Leu Gly Pro Gly Met Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Gly Ile Tyr Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu Glu Arg Ile Arg Glu  
 85 90 95  
 Lys Thr Gly Ile Tyr Ile Thr Arg Gly Val Val Val His Ala Leu Asp  
 100 105 110  
 Arg Glu Lys Lys Trp Ala Trp Thr Pro Met Val Lys Pro Gly Asp Glu  
 115 120 125  
 Val Arg Gly Gly Met Val Leu Gly Thr Val Pro Glu Phe Gly Phe Thr  
 130 135 140  
 His Lys Ile Leu Val Pro Pro Asp Val Arg Gly Arg Val Lys Glu Val  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Ala Gly Glu Tyr Thr Val Glu Glu Pro Val Val Val Leu Glu  
 165 170 175  
 Asp Gly Thr Glu Leu Lys Met Tyr His Thr Trp Pro Val Arg Arg Ala  
 180 185 190  
 Arg Pro Val Gln Arg Lys Leu Asp Pro Asn Thr Pro Phe Leu Thr Gly  
 195 200 205  
 Met Arg Ile Leu Asp Val Leu Phe Pro Val Ala Met Gly Gly Thr Ala  
 210 215 220  
 Ala Ile Pro Gly Pro Phe Gly Ser Gly Lys Thr Val Thr Gln Gln Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Ala Lys Trp Ser Asn Ala Asp Val Val Val Tyr Val Gly Cys Gly  
 245 250 255  
 Glu Arg Gly Asn Glu Met Thr Asp Val Leu Val Glu Phe Pro Glu Leu  
 260 265 270  
 Thr Asp Pro Lys Thr Gly Gly Pro Leu Met His Arg Thr Val Leu Ile  
 275 280 285  
 Ala Asn Thr Ser Asn Met Pro Val Ala Ala Arg Glu Ala Ser Ile Tyr  
 290 295 300

10/13

Val Gly Val Thr Ile Ala Glu Tyr Phe Arg Asp Gln Gly Phe Ser Val  
 305 310 315 320  
 Ala Leu Met Ala Asp Ser Thr Ser Arg Trp Ala Glu Ala Leu Arg Glu  
 325 330 335  
 Ile Ser Ser Arg Leu Glu Glu Met Pro Ala Glu Glu Gly Tyr Pro Pro  
 340 345 350  
 Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ala Ala Phe Tyr Glu Arg Ala Gly Lys Val  
 355 360 365  
 Ile Thr Leu Gly Gly Glu Glu Gly Ala Val Thr Ile Val Gly Ala Val  
 370 375 380  
 Ser Pro Pro Gly Gly Asp Met Ser Glu Pro Val Thr Gln Ser Thr Leu  
 385 390 395 400  
 Arg Ile Val Gly Ala Phe Trp Arg Leu Asp Ala Ser Leu Ala Phe Arg  
 405 410 415  
 Arg His Phe Pro Ala Ile Asn Trp Asn Gly Ser Tyr Ser Leu Phe Thr  
 420 425 430  
 Ser Ala Leu Asp Pro Trp Tyr Arg Glu Asn Val Ala Glu Asp Tyr Pro  
 435 440 445  
 Glu Leu Arg Asp Ala Ile Ser Glu Leu Leu Gln Arg Glu Ala Gly Leu  
 450 455 460  
 Gln Glu Ile Val Gln Leu Val Gly Pro Asp Ala Leu Gln Asp Ala Glu  
 465 470 475 480  
 Arg Leu Val Ile Glu Val Gly Arg Ile Ile Arg Glu Asp Phe Leu Gln  
 485 490 495  
 Gln Asn Ala Tyr His Glu Val Asp Ala Tyr Cys Ser Met Lys Lys Ala  
 500 505 510  
 Tyr Gly Ile Met Lys Met Ile Leu Ala Phe Tyr Lys Glu Ala Glu Ala  
 515 520 525  
 Ala Ile Lys Arg Gly Val Ser Ile Asp Glu Ile Leu Gln Leu Pro Val  
 530 535 540  
 Leu Glu Arg Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Val Ser Glu Glu Glu Phe Pro  
 545 550 555 560  
 Ala Tyr Phe Glu Glu Ala Met Lys Glu Ile Gln Gly Ala Phe Lys Ala  
 565 570 575  
 Leu Ala  
 <210> 4  
 <211> 478  
 <212> PRT  
 <213> *Thermus thermophilus*

11/13

&lt;400&gt; 4

```

Met Asp Leu Leu Lys Lys Glu Tyr Thr Gly Ile Thr Tyr Ile Ser Gly
  1           5           10           15
Pro Leu Leu Phe Val Glu Asn Ala Lys Asp Leu Ala Tyr Gly Ala Ile
      20           25           30
Val Asp Ile Lys Asp Gly Thr Gly Arg Val Arg Gly Gly Gln Val Ile
      35           40           45
Glu Val Ser Glu Glu Tyr Ala Val Ile Gln Val Phe Glu Glu Thr Thr
      50           55           60
Gly Leu Asp Leu Ala Thr Thr Ser Val Ser Leu Val Glu Asp Val Ala
      65           70           75           80
Arg Leu Gly Val Ser Lys Glu Met Leu Gly Arg Arg Phe Asn Gly Ile
      85           90           95
Gly Lys Pro Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ile Thr Pro Glu Lys Arg Leu
      100          105          110
Pro Ile Thr Gly Leu Pro Leu Asn Pro Val Ala Arg Arg Lys Pro Glu
      115          120          125
Gln Phe Ile Gln Thr Gly Ile Ser Thr Ile Asp Val Met Asn Thr Leu
      130          135          140
Val Arg Gly Gln Lys Leu Pro Ile Phe Ser Gly Ser Gly Leu Pro Ala
      145          150          155          160
Asn Glu Ile Ala Ala Gln Ile Ala Arg Gln Ala Thr Val Arg Pro Asp
      165          170          175
Leu Ser Gly Glu Gly Glu Lys Glu Glu Pro Phe Ala Val Val Phe Ala
      180          185          190
Ala Met Gly Ile Thr Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Ile Gln Glu Phe
      195          200          205
Glu Arg Thr Gly Ala Leu Ser Arg Ser Val Leu Phe Leu Asn Lys Ala
      210          215          220
Asp Asp Pro Thr Ile Glu Arg Ile Leu Thr Pro Arg Met Ala Leu Thr
      225          230          235          240
Val Ala Glu Tyr Leu Ala Phe Glu His Asp Tyr His Val Leu Val Ile
      245          250          255
Leu Thr Asp Met Thr Asn Tyr Cys Glu Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ala
      260          265          270
Ala Arg Glu Glu Ile Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Pro Gly Tyr Met Tyr
      275          280          285
Thr Asp Leu Ala Thr Ile Tyr Glu Arg Ala Gly Val Val Glu Gly Lys
      290          295          300

```



12/13

Lys Gly Ser Val Thr Gln Ile Pro Ile Leu Ser Met Pro Asp Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Arg Thr His Pro Ile Pro Asp Leu Thr Gly Tyr Ile Thr Glu Gly Gln  
 325 330 335  
 Ile Gln Leu Ser Arg Glu Leu His Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Pro Ile  
 340 345 350  
 Asp Pro Leu Pro Ser Leu Ser Arg Leu Met Asn Asn Gly Val Gly Lys  
 355 360 365  
 Gly Lys Thr Arg Glu Asp His Lys Gln Val Ser Asp Gln Leu Tyr Ser  
 370 375 380  
 Ala Tyr Ala Asn Gly Val Asp Ile Arg Lys Leu Val Ala Ile Ile Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Ala Leu Thr Glu Asn Asp Arg Arg Tyr Leu Gln Phe Ala Asp  
 405 410 415  
 Ala Phe Glu Arg Phe Phe Ile Asn Gln Gly Gln Gln Asn Arg Ser Ile  
 420 425 430  
 Glu Glu Ser Leu Gln Ile Ala Trp Ala Leu Leu Ser Met Leu Pro Gln  
 435 440 445  
 Gly Glu Leu Lys Arg Ile Ser Lys Asp His Ile Gly Lys Tyr Tyr Gly  
 450 455 460  
 Gln Lys Leu Glu Glu Ile Trp Gly Ala Pro Gln Ala Leu Asp  
 465 470 475  
 <210> 5  
 <211> 223  
 <212> PRT  
 <213> Thermus thermophilus  
 <400> 5  
 Met Ser Gln Val Ser Pro Thr Arg Met Asn Leu Leu Gln Arg Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Arg Leu Ala Gln Lys Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Lys Arg  
 20 25 30  
 Asp Ala Leu Val Ala Glu Phe Phe Gly Leu Val Arg Glu Ala Met Glu  
 35 40 45  
 Ala Arg Lys Ala Leu Asp Gln Ala Ala Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Leu  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Gln Ala Phe Asp Gly Pro Glu Val Val Ala Gly Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Val Pro Pro Leu Glu Gly Val Glu Ala Glu Val Glu Asn Val  
 85 90 95

13/13

Trp	Gly	Ser	Lys	Val	Pro	Arg	Leu	Lys	Ala	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly	Ala
			100					105					110		
Leu	Leu	Ser	Pro	Val	Gly	Thr	Pro	Ala	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ser	Arg
		115					120					125			
Ala	Phe	Arg	Arg	Tyr	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Arg	Val	Ala	Asn	Thr	Glu
	130					135					140				
Thr	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Gly	Glu	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Thr	Arg	Arg
145					150					155					160
Val	Asn	Ala	Leu	Glu	Gln	Val	Val	Ile	Pro	Gly	Ile	Arg	Ala	Gln	Ile
				165					170					175	
Arg	Phe	Ile	Gln	Gln	Val	Leu	Glu	Gln	Arg	Glu	Arg	Glu	Asp	Thr	Phe
			180					185					190		
Arg	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu
		195					200					205			
Glu	Gly	Gly	Arg	Pro	Asn	Pro	Gln	Val	Glu	Ile	Gly	Ala	Gly	Leu	
	210						215					220			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12982A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/16, 15/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/16, 15/55

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	YOKOYAMA, K. et al., Thermus thermophilus membrane-associated ATPase., Indication of a eubacterial V-type ATPase., J.Biol.Chem., 1990, 265(35), p.21946-50	1-4/6-10/5
X/Y/A	YOKOYAMA, K. et al., Isolation of prokaryotic V <sub>0</sub> V <sub>1</sub> -ATPase from a thermophilic eubacterium Thermus thermophilus., J.Biol.Chem., 1994, 269(16), p.12248-53	1-4/6-10/5
X/Y/A	YOKOYAMA, K. et al., V-ATPase of Thermus thermophilus is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP.J.Biol.Chem., 1998, 273(32), p.20504-10	1-4/6-10/5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 December, 2003 (08.12.03)Date of mailing of the international search report  
24 December, 2003 (24.12.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.  
PCT/JP03/12982

PCT/JP03/12982

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	YOKOYAMA, K. et al., V-Type H <sup>+</sup> -ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, thermus thermophilus. Subunit structure and operon., J.Biol. Chem., 2000, 275(18), p.13955-61	1-4/6-10/5
Y/A	KATO-YAMADA, Y. et al., Direct observation of the rotation of $\epsilon$ subunit in F <sub>1</sub> -ATPase., J.Biol.Chem., 1998, 273(31), p.19375-7	6-10/1-5
Y/A	NOJI, H. et al., Direct observation of the rotation of F <sub>1</sub> -ATPase., Nature, 1997, 386(6622), p.299-302	6-10/1-5
P,X	IMAMURA, H. et al., Evidence for rotation of V <sub>1</sub> -ATPase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2003, March, 100(5), p.2312-5	1-10
P,X	YOKOYAMA, K., Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase., J.Biol.Chem., 04 July, 2003 (04.07.03), 278(27), p.24255-8	1-10
A	TSUNODA, S.P. et al., Observations of rotation within the F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase: deciding between rotation of the F <sub>0</sub> c subunit ring and artifact., FEBS Lett., 31 March, 2000 (31.03.00); 470(3): 244-8	1-10
A	MATSUI, T. et al., Catalytic activity of the $\alpha\beta\gamma$ complex of F <sub>1</sub> -ATPase without noncatalytic nucleotide binding site., J.Biol.Chem., 1997, 272(13), p.8215-21	1-10
A	BALD D. et al., ATP synthesis by F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition., J. Biol.Chem., 1998, 273(2), p.865-70	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/16, 15/55

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N9/16, 15/55

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	YOKOYAMA K. et al., Thermus thermophilus membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase. J. Biol. Chem., 1990, 265(35), p. 21946-50	1-4/6-10/5
X/Y/A	YOKOYAMA K. et al., Isolation of prokaryotic V <sub>0</sub> V <sub>1</sub> -ATPase from a thermophilic eubacterium Thermus thermophilus. J. Biol. Chem., 1994, 269(16), p. 12248-53	1-4/6-10/5

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	YOKOYAMA K. et al., V-ATPase of <i>Thermus thermophilus</i> is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. J. Biol. Chem., 1998, 273(32), p. 20504-10	1-4/6-10/5
X/Y/A	YOKOYAMA K. et al., V-Type H <sup>+</sup> -ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, <i>Thermus thermophilus</i> . Subunit structure and operon. J. Biol. Chem., 2000, 275(18), p. 13955-61	1-4/6-10/5
Y/A	KATO-YAMADA Y. et al., Direct observation of the rotation of $\epsilon$ subunit in F <sub>1</sub> -ATPase. J. Biol. Chem., 1998, 273(31), p. 19375-7	6-10/1-5
Y/A	NOJI H. et al., Direct observation of the rotation of F <sub>1</sub> -ATPase. Nature, 1997, 386(6622), p. 299-302	6-10/1-5
PX	IMAMURA H. et al., Evidence for rotation of V <sub>1</sub> -ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003 Mar, 100(5), p. 2312-5	1-10
PX	YOKOYAMA K., Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. J. Biol. Chem., 2003 Jul 4, 278(27), p. 24255-8	1-10
A	TSUNODA S. P. et al., Observations of rotation within the F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase: deciding between rotation of the F <sub>0</sub> c subunit ring and artifact. FEBS Lett. 2000 Mar 31;470(3):244-8.	1-10
A	MATSUI T. et al., Catalytic activity of the $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ complex of F <sub>1</sub> -ATPase without noncatalytic nucleotide binding site. J. Biol. Chem., 1997, 272(13), p. 8215-21	1-10
A	BALD D. et al., ATP synthesis by F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. J. Biol. Chem., 1998, 273(2), p. 865-70	1-10